

## پاسخهای ایمنی سگهای آلوده به *لیشمانیا اینفانتوم* علیه سیستئین پروتئینازهای نوترکیب نوع I و II

علیرضا نخعی<sup>۱</sup>، سیما رأفتی<sup>۲\*</sup>، علی هاتف سلمانیان<sup>۳</sup>، محمد تقی خانی<sup>۴</sup>، مهدی محبعی<sup>۵</sup>، طاهره طاهری<sup>۶</sup>

- ۱- استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
- ۲- دانشیار گروه ایمنولوژی، آزمایشگاه ایمنولوژی ملکولی، بخش ایمونولوژی انتیتوپاستور ایران، تهران، ایران
- ۳- استادیار مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران، ایران
- ۴- دانشیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استاد گروه انگل شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ۶- کارشناس ارشد ژنتیک، بخش ایمونولوژی انتیتوپاستور ایران، تهران، ایران

### چکیده

هدف: بررسی پاسخهای ایمنی هومورال و سلولی سگهای آلوده به *لیشمانیا اینفانتوم*<sup>۱</sup> نسبت به پروتئینهای نوترکیب سیستئین پروتئینازهای نوع I و II و پیتید سترزی مربوط به انتهای کربوکسی (CTE)<sup>۲</sup> سیستئین پروتئیناز نوع I.

روش کار: ۱۴ قلاوه سگ آلوده به *لیشمانیا اینفانتوم* (۷ قلاوه دارای تظاهرات بالینی<sup>۳</sup> و ۷ قلاوه دیگر بدون علایم ظاهری<sup>۴</sup>) از یک ناحیه آندمیک ایران و سه قلاوه سگ طبیعی از نواحی غیر آندمیک انتخاب شدند. پاسخهای ایمنی هومورال و سلولی آنها بترتیب به روش الیزا و آزمایش پرولیفراسیون لنفوسيتها، نسبت به پروتئینهای نوترکیب سیستئین پروتئینازهای نوع I (rCPA)II<sup>۵</sup>، (rCPB)I<sup>۶</sup>، پیتید سترزی مربوط به انتهای کربوکسی (CTE) سیستئین پروتئیناز نوع I و آنتی ژنهای منجمد - ذوب شده (F/T)<sup>۷</sup> *لیشمانیا اینفانتوم* مورد بررسی قرار گرفت. میزان آنتی بادی کلاس IgG و زیر کلاسهای IgG1 و IgG2<sup>۸</sup> و پرولیفراسیون لنفوسيتها نسبت به آنتی ژنهای فوق اندازه گیری گردید.

نتایج و بحث: نتایج نشان می دهد بالاترین پاسخ سلولی در هر دو گروه حیوانات (دارای علایم و بدون علایم ظاهری) مربوط به آنتی ژنهای منجمد - ذوب شده انگل می باشد، پاسخ سلولی متوسطی نسبت به سیستئین پروتئینازهای نوترکیب (CTE) (rCPB) و (rCPA) میزان آنتی بادی IgG1<sup>۹</sup> و IgG2<sup>۱۰</sup> کل<sup>۱۱</sup>، IgG1<sup>۱۲</sup> و IgG2<sup>۱۳</sup> علیه rCRA در هر دو گروه پایین است اما CTE و rCPB (هر دو به یک میزان) بخوبی سیستم ایمنی هومورال تمام سگها را تحريك می نمایند. در سگهای بدون علایم میزان IgG2 علیه پروتئینهای مذبور نسبت به میزان IgG1 بالاست. نتایج تحقیق همچنین نشان می دهد که پاسخهای ایمنی نسبت به CTE و CPB تقریباً در تمام سگها یکسان است بنابراین با توجه به اینکه CTE بخش انتهایی سیستئین پروتئیناز نوع I می باشد، به نظر می رسد بخش اعظم خاصیت ایمنی CPB مربوط به این ناحیه است.

نتیجه گیری: CTE و CPB هر دو نوع پاسخ ایمنی سلولی و هومورال سگهای آلوده به *لیشمانیا اینفانتوم* را بخوبی تحريك می کنند اما CPA ایمنوزن نسبتاً ضعیفتری است.

کلید واژگان: *لیشمانیا اینفانتوم*، سیستئین پروتئیناز، بخش انتهایی کربوکسی (CTE)، لیشمانیوز احشایی، ایمنی هومورال و سلولی.

## ۱- مقدمه

می‌گردد، این سلولها  $\gamma$ -IFN و IL-۲ را تولید می‌کنند و به دنبال آن انگل از بین می‌رود؛ در حالت دوم که در حیوانات حساس اتفاق می‌افتد، پاسخ Th2 القا می‌شود، این امر با تولید IL-۴ و IL-۱۰ به تکثیر انگل و پیشرفت بیماری متنه می‌گردد [۱۰-۱۱]. مطالعات در سگها نیز نشان می‌دهد که ظهور بیماری با افزایش آنتی‌بادی، عدم پاسخ سلولی و تولید  $\gamma$ -IFN و IL-۲ در ارتباط است [۱۲].

طی ده سال گذشته و در تحقیقات برای تهیه یک واکسن زیر واحدی مناسب چندین آنتی‌ژن محافظت کننده<sup>۱</sup> مثل Lcr [۱۳]، LeIF [۱۸] hsp70 [۱۷] TSA [۱۶] gp63 [۱۵] و CPs [۲۲] Lms11 [۱۹] Ldp23 [۲۰]، هیستون H1 [۲۱] و L.major شناسایی و به طور عمده در مدل موشی برعلیه انگل مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق ما به منظور بررسی پتانسیل محافظت کننده سیستئین پروتئینازهای نوترکیب نوع I و II لیشمانیا اینفانتوم، ایمونوژنیته این پروتئینها را در تعدادی سگ آلوده از منطقه مشکین شهر مطالعه کردیم. سیستئین پروتئینازهای لیشمانیا، آندوپیتیدازهای شبیه کاتپسینهای پستانداران می‌باشد که در لیزوژوم بزرگی به نام مگازوم قرار دارند [۲۳]؛ این آندوپیتیدازها در شکل آماتیگوت و کمتر در متاسیکلیک پروماسیگوت بیان می‌شوند [۲۴]. در گونه‌های مختلف لیشمانیا به طور کلی سه گروه سیستئین پروتئیناز شناسایی شده‌اند که از این میان سیستئین پروتئینازهای نوع (CPB)I و نوع (CPA)II از نظر ساختمانی شبیه کاتپسینهای L پستاندارانند [۲۵-۲۶]. در لیشمانیا مکربکانا آنزیمهای نوع I به وسیله ۱۹ کپی ژن و در لیشمانیا دونووانی به وسیله ۵ کپی ژن که در یک توالي پشت سرهم قرار گرفته‌اند<sup>۲</sup>، کد می‌شوند [۲۷-۲۸]. این نوع سیستئین پروتئینازها دارای یک بخش گسترده حدود ۱۰۰ اسید آمینه‌ای در انتهای کربوکسی (CTE) می‌باشد که در کاتپسینهای پستانداران وجود ندارد [۲۹].

سیستئین پروتئینازهای نوع II به وسیله یک ژن منفرد کد می‌شوند و دارای CTE کوتاه حدود ۱۰ اسید آمینه‌ای می‌باشند [۳۰]. علی‌رغم نامشخص بودن نقش دقیق سیستئین پروتئینازها در لیشمانیا، نشان داده شده است که در بقای انگل داخل ماکروفاژها نقش دارند؛ این نقش به گونه‌ای است که در حضور

لیشمانیوز گروهی از بیماریهای انگلی‌اند که به وسیله پروتوزوآ جنس لیشمانیا به وجود می‌آیند، سه شکل این بیماری در انسان شامل لیشمانیوز پوستی، پوستی - مخاطی و احشایی (کالا آزار) است. لیشمانیوز احشایی خطرناک‌ترین شکل این بیماری است که در ۶۲ کشور جهان از جمله ایران اندمیک است. عامل لیشمانیوز احشایی *L.donovani* و *L.chagasi* *L.infantum* می‌باشد و در نواحی مدیترانه‌ای و ایران این بیماری به وسیله گونه

*L.infantum* به وجود می‌آید [۲-۱].

لیشمانیا دارای دو شکل مرفو‌لوژیکی اصلی است: آماتیگوت که در ماکروفاژهای میزبان پستاندار زندگی می‌کند و پرماتیگوت که در معدة پشه خاکی رشد می‌کند. انگل توسط پشه خاکی ماده از جنس فلوبوتوموس<sup>۳</sup> و لوتزومیا<sup>۴</sup> به انسان منتقل می‌شود [۱]. کالا آزار در انسان با تب نامنظم، بزرگی طحال، بزرگی کبد، هیپرگاماگلوبلینمی<sup>۵</sup>، کم خونی و لاغری مشخص می‌شود [۳]. اگر تشخیص و درمان این بیماری به موقع انجام نشود، ۹۰-۹۵ درصد مرگ به دنبال خواهد داشت [۴].

مخزن اصلی لیشمانیا اینفانتوم سگها بیند، بجز ضایعات جلدی، ریزش مو، بزرگی و پیچیدگی ناخنها که عالیم اختصاصی لیشمانیوز احشایی سگها (CVL)<sup>۶</sup> می‌باشد، عالیم دیگر بیماری در سگها شبیه انسان است [۵].

کترل CVL علاوه بر اهمیتی که در دامپزشکی دارد، از نظر پژوهشی و بهداشتی (کترل بیماری انسانی) نیز بسیار مهم می‌باشد. برای کترول و پیشگیری کالا آزار مبارزه با ناقلان، مفید به نظر نمی‌رسد [۶]؛ درمان سگها نیز علاوه بر هزینه زیاد و عود مجدد بیماری، سوش مقاوم انگل نسبت به دارو را ایجاد خواهد کرد [۷]؛ بنابراین با توجه به اینکه پس از بهبودی در انسان و سگ ایمنی حاصل می‌شود، واکسیناسیون سگها یکی از راههای مهم کترول بیماری است [۸-۹]. یک واکسن مناسب علیه لیشمانیا به طور عمده باید پاسخ ایمنی از نوع H1 را باعث شود.

مطالعات انجام شده روی موش و انسان در ارتباط با ایمنولوژی لیشمانیا نشان می‌دهد که پس از ورود انگل به بدن بسته به شرایط میزبان، دو پدیده رخ می‌دهد: در حالت اول در حیواناتی که از نظر ژنتیکی مقاوم به انگلند سلولهای Th1 القا

1. Phlebotomus

2. Lutzomyia

3. Hypergammaglobulinemia

4. Canine Visceral Leishmaniasis (CVL)

5. Protective

6. Multicopy in a tandem array

(MCAN/۹۸/LLM-۸۷۷) با پاساز مکرر در هامستر نگهداری شدند. دو تا سه ماه پس از آلودگی هامستر، طحال آن جدا و پس از هموژنیزه شدن، در محیط NNN در حضور  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  جنتامایسین کشت داده شد. سپس پروماستیگوتها به وسیله سانتریفیوز محیط کشت در دور  $270\text{ g}$  به مدت ۱۰ دقیقه در  $4^{\circ}\text{C}$  جمع‌آوری شدند و پس از سه بار شستشو در  $1/75\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ،  $2/5\text{ mM KCl}$ ،  $137\text{ mM NaCl}$  PBS،  $1/75\text{ mM Na}_3\text{HPO}_4$  (۸ mM)، سوسپانسیونی با غلظت  $2\times 10^8$  سلول در میلی لیتر تهیه و پس از ۱۰ مرحله ذوب و انجاماد<sup>۳</sup> در ازت مایع، غلظت پروتئینی آن با روش برادرورد تعیین و تا زمان استفاده در  $70^{\circ}\text{C}$ -نگهداری شد.

## ۲-۲-۲- تهیه پروتئینهای نوترکیب سیستئن پروتئینازها

تکثیر ژنهای *CPB* و *CPA* لیشمانیا اینفانتوم با استفاده از پرایمرهایی که قبلًا برای تکثیر ژنهای *CPB* و *CPA* لیشمانیا مژور طراحی شده بود [۳۶]، انجام شد. این مورد به طور مشروح در جای دیگری گزارش شده است [۳۷]. به طور اجمالی ژنهای *CPs* در یک مخلوط محتوی  $0/2\text{ mM dNTP}$ ،  $1/5\text{ mM MgCl}_2$ ،  $50\text{ mM KCl}$ ،  $10\text{ mM TrisHCl pH}8/2$  و  $2/5\text{ Unit Taq DNA polymerase}$ ٪ ژلاتین،  $100\text{ pmole}$  از هر پرایمر و  $10\text{ }\mu\text{g}$  از DNA ژنومیک در حجم کل  $50\text{ }\mu\text{l}$  تکثیر شدند. شرایط تکثیر برای هر دو ژن یکسان و شامل  $30$  سیکل ( $95^{\circ}\text{C}$  یک دقیقه،  $68^{\circ}\text{C}$  دو دقیقه و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت  $3$  دقیقه) می‌باشد. محصول PCR با آنزیمهای *BamHI* (تهیه شده از شرکت Roche آلمان) بریده و پس از خالص کردن آن با استفاده از کیت *pGEMII Purification* (ساخت شرکت Qiagen) در ناقل *pET2ra* (*Hind III*) (تهیه شده از شرکت پرومگا<sup>۴</sup> کلون و به کمک پرایمرهای استاندارد *T7* و *SP6* توالی آنها تعیین گردید. سپس ژنهای *CPB* و *CPA* به طور جداگانه در جایگاه اثر آنزیمهای *BamHI* و *Hind III* ناقل بیانی پروکاریوتی (خریداری شده از شرکت نوواگن<sup>۵</sup> در پایین دست<sup>۶</sup> پرموتور *T7* کلون گردیدند.

مهرارکننده‌های این آنزیمهها رشد انگل متوقف می‌شود [۳۱]. از نظر اینمولوزیکی بخش CTE سیستئن پروتئیناز نوع I هم احتمالاً در تغییر پاسخهای ایمنی و فرار از سیستم ایمنی میزبان نقش دارد [۳۲].

با توجه به نقشهای سیستئن پروتئینازها پتانسیل آنها به عنوان اهداف داروهای جدید و کاندیدای واکسن مورد توجه قرار گرفته است [۳۳]. در مطالعات قبلی به وسیله رافتی و همکاران نشان داده شد که فرم طبیعی<sup>۱</sup> سیستئن پروتئینازهای لیشمانیا مژور به وسیله لنفوسيتهای انسان و موش‌های آلوده شناسایی می‌گردد [۳۴، ۳۵]. همچنین افراد مبتلا یا بهبود یافته از لیشمانیوز پوستی پروتئینهای نوترکیب نوع I و II لیشمانیا مژور را تشخیص می‌دهند [۳۶]. بر همین اساس در این مطالعه با بررسی پاسخهای ایمنی سلولی و هومورال سگهای آلوده نسبت به *rCPB*، *rCPA*، *CTE*، مشخص شد *rCPB* و *rCPA* به وسیله سیستم ایمنی این حیوانات شناسایی می‌شوند و در سگهای بدون علایم بالینی ( مقاوم ) می‌توانند سلولهای T را تحریک و باعث تولید میزان قابل توجهی IgG2 شوند.

## ۲- مواد و روش کار

### ۱- حیوانات

چهارده قلاده سگ آلوده از نژاد، سن و جنس مختلف از منطقه آندمیک مشکین شهر در شمال غربی ایران انتخاب شد، مدت آلودگی در این سگها نامشخص و آلودگی به وسیله آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم<sup>۲</sup> Dipstick rk<sup>۳۹</sup>، وسترن بلات و روشهای انگل شناسی تأیید گردید. حیوانات بر اساس علایم بالینی به دو گروه تقسیم شدند: سگهای دارای علایم که شامل لاغری مفرط، بزرگی طحال، ریزش مو و زخم‌های پوستی می‌باشد؛ سگهای بدون تظاهرات بالینی که هیچگونه علایمی نداشتند اما از نظر آلودگی مثبت بودند. سه قلاده سگ از نواحی غیر آندمیک به عنوان کنترل استفاده شدند.

### ۲- آنتی ژنها

#### ۲-۱- تهیه آنتی ژن خام لیشمانیا اینفانتوم (F/T) پروماستیگوتها لیشمانیا اینفانتوم (S-مشوش)

1. Native
2. Direct Agglutination Test (DAT)

3. Freezing/Thawing (F/T)

4. Promega

5. Novagen

6. Downstream

گردید؛ در ادامه برای بررسی خلوص، پروتئینها در ژل SDS-PAGE الکتروفورز و با کوماسی بلو رنگ آمیزی شدند.

### ۲-۲-۳- پپتید سنتزی<sup>۱</sup> CTE

این پپتید به طور شیمیابی به روش Solid Phase Fmoc Chemistry و بر مبنای اطلاعات راجر<sup>۷</sup> و همکاران به وسیله شرکت دیکتاجین<sup>۸</sup> در کشور سوئیس ساخته شده است [۳۹]. این پپتید دارای ۱۰۸ اسید آمینه است و از اسید آمینه ۳۱۸-۲۰۹ سیستین پروتئیناز نوع I را شامل می‌شود.

### ۳-۲- الیزا

آنتی‌بادیهای ضد انگل لیشمانیا و سیستین پروتئینازها، در سرم سگهای آلووده به روش الیزا اندازه‌گیری شدند. به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با جذب بالا<sup>۹</sup> (Nunc, UK) ۱۰۰ µl (Nunc, UK) از غلظت ۱۰ µg/ml هر آنتی‌زن (CTE, rCPB, rCPA, F/T) اضافه و به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد، و پس از سه مرحله شستشو در بافر شستشو (PBS محتوی ۰/۰۵ تویین<sup>۱۰</sup>٪، ۱۰۰ µl، ۴°C/دقیقه ۲۰ g/۸۰۰۰) در بافر شستشو (۱ mM EDTA، ۲۰ mM Tris-HCl، ۱۰ mM NaCl، pH ۸) حل و یک شب در ۲۰°C-نگهداری شد. ذرات متراکم (IBs)<sup>۱۱</sup> محتوی پروتئینهای نوترکیب با چند مرحله سانتریفوژ (۱ mM EDTA در بافر شستشو (۴°C/دقیقه ۱۰ g/۳۳۰۰) و رسوب باکتریایی در بافر لیزکننده (۱۰ mM NaCl، ۱۰ mM EDTA، pH ۸) حل و یک شب در ۲۰°C-نگهداری شد. ذرات متراکم (IBs)<sup>۱۲</sup> محتوی پروتئینهای نوترکیب با چند مرحله سانتریفوژ (۱۰ mM EDTA در بافر شستشو (۴°C/دقیقه ۲۰ g/۸۰۰۰) در بافر شستشو (۲۰ mM Tris-HCl، ۲۰ mM NaCl، pH ۷/۸) جمع‌آوری و پروتئینهای نوترکیب طی دو مرحله الکتروفورز در ژل SDS-PAGE و استفاده از رنگ آمیزی معکوس<sup>۱۳</sup> خالص گردید [۳۸]. به طور خلاصه آنکه IBs در بافر نمونه (۲۰ mM Tris pH ۷/۸، ۱۰٪ سدیم دودسیل سولفات<sup>۱۴</sup>، ۲٪ مراکاپتو اتانول، ۰/۲۰٪ گلیسرول و ۰/۰۰۱٪ بروموفنل آبی) حل و پس از ۵ دقیقه جوشاندن، در ژل SDS-PAGE (۱۲/۵٪ الکتروفورز شد، بلا فاصله پس از آن ژل به مدت ۵ دقیقه در کربنات سدیم ۱/۵٪ غوطه‌ور گردید، سپس به محلول ۰/۰۰۱ ایمیدازول حاوی ۰/۰۱٪ SDS متنقل و به مدت ۱۵ دقیقه به آرامی تکان داده شد. آنگاه محلول ایمیدازول خالی شد و ژل به مدت ۳۰ ثانیه در محلول ۰/۲M سولفات روی قرار گرفت تا نوارهای شفاف پروتئینی در زمینه کدر ژل ظاهر شدند. نوار مربوط به پروتئین نوترکیب جدا و در محلول کربنات آمونیوم ۰/۰۰۱ M حاوی ۰/۰۰۱ M SDS قرار گرفت. سوسپانسیون حاصل یک شب روی همزن قرار گرفت، سپس با نیروی ۳۳۰۰ g در دمای ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی آن جمع شد؛ محلول به دست آمده با استفاده از فیلتراسیون با فشار بالا<sup>۱۵</sup> به وسیله دستگاه فیلتر کننده آمیکون (MWCO: ۱۰ KD) تغلیظ و در مقابل PBS دیالیز

6. Synthetic peptide

7. Roggero

8. Dictagene

9. Maxisorb

10. Tween

11. Bethyl Laboratories, INC, Montgomery, USA

12. O-Phenylenediamine (OPD)

پلاسمیدهای حاوی این زنها به باکتری *E.coli* سوش (BL21(DE3)) ترانسفرم شدند. برای بیان و تخلیص پروتئینهای نوترکیب به ۱۰۰ ml محیط LB محتوی آمپیسیلین (۱۰۰ µg/ml) و کلرامفنیکل (۲/۵ µg/ml) از کشت شبانه کلون *pET22a-CPB* یا *pET22a-CPA* اضافه شد. سپس در انکوباتور ۳۷°C شیکردار قرار گرفت تا آنکه OD<sub>600</sub> کشت به ۰/۸ رسید؛ سرانجام به محیط کشت ایزوپروپیل تیوگالاكتوزید<sup>۱</sup> با غلظت نهایی ۱ mM اضافه و به مدت ۴ ساعت دیگر نگهداری شد. پس از طی این مدت محیط کشت سانتریفوژ گردید (۴°C/دقیقه ۱۰ g/۳۳۰۰) و رسوب باکتریایی در بافر لیزکننده (۱۰ mM NaCl، ۱۰ mM EDTA، pH ۸) حل و یک شب در ۲۰°C-نگهداری شد. ذرات متراکم (IBs)<sup>۱۶</sup> محتوی پروتئینهای نوترکیب با چند مرحله سانتریفوژ (۱ mM EDTA در بافر شستشو (۴°C/دقیقه ۲۰ g/۸۰۰۰) در بافر شستشو (۲۰ mM Tris-HCl، ۲۰ mM NaCl، pH ۷/۸) جمع‌آوری و پروتئینهای نوترکیب طی دو مرحله الکتروفورز در ژل SDS-PAGE و استفاده از رنگ آمیزی معکوس<sup>۱۷</sup> خالص گردید [۳۸]. به طور خلاصه آنکه IBs در بافر نمونه (۲۰ mM Tris pH ۷/۸، ۱۰٪ سدیم دودسیل سولفات<sup>۱۸</sup>، ۲٪ مراکاپتو اتانول، ۰/۲۰٪ گلیسرول و ۰/۰۰۱٪ بروموفنل آبی) حل و پس از ۵ دقیقه جوشاندن، در ژل SDS-PAGE (۱۲/۵٪ الکتروفورز شد، بلا فاصله پس از آن ژل به مدت ۵ دقیقه در کربنات سدیم ۱/۵٪ غوطه‌ور گردید، سپس به محلول ۰/۰۰۱ ایمیدازول حاوی ۰/۰۱٪ SDS متنقل و به مدت ۱۵ دقیقه به آرامی تکان داده شد. آنگاه محلول ایمیدازول خالی شد و ژل به مدت ۳۰ ثانیه در محلول ۰/۲M سولفات روی قرار گرفت تا نوارهای شفاف پروتئینی در زمینه کدر ژل ظاهر شدند. نوار مربوط به پروتئین نوترکیب جدا و در محلول کربنات آمونیوم ۰/۰۰۱ M حاوی ۰/۰۰۱ M SDS قرار گرفت. سوسپانسیون حاصل یک شب روی همزن قرار گرفت، سپس با نیروی ۳۳۰۰ g در دمای ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی آن جمع شد؛ محلول به دست آمده با استفاده از فیلتراسیون با فشار بالا<sup>۱۹</sup> به وسیله دستگاه فیلتر کننده آمیکون (MWCO: ۱۰ KD) تغلیظ و در مقابل PBS دیالیز

1. Isopropylthiogalactoside (IPTG)

2. Inclusion Bodies (IBs)

3. Imidazole-SDS-Zn Reverse Staining

4. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

5. Ultrafiltration

غیاب آنتیژن محاسبه و SI بزرگتر از  $2/5$  به عنوان پاسخ مثبت در نظر گرفته شد.

## ۲-۵- محاسبات آماری

تفاوت پاسخهای سلولی و هومورال سگهای آلوده با استفاده از  $t$ -test معنادار در نظر محسوبه و در صورت  $p < 0.05$  تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

## ۳- نتایج

### ۳-۱- سگهای حساس و مقاوم

سگهای آلوده براساس بررسیهای بالینی و انگلشناسی به دو گروه تقسیم شدند: سگهای دارای عالیم یا حساس به تعداد هفت قلاده و سگهای عالیم یا مقاوم به تعداد ۷ قلاده. بیماری در هر دو گروه با استفاده از DAT و Dipstick تأیید شد. همه سگهای دارای عالیم از نظر انگلشناسی مثبت بودند و عالیمی از قبیل زخمها پوسی، لاغری مفرط، ریزش مو و پیچیدگی ناخنها با درصد متفاوتی در آنها مشاهده می شد (نتایج مشاهدات در جدول ۱ ارائه شده است).

## ۲-۶- اندازه‌گیری پرولیفراسیون لنفوسيتها

سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) <sup>۱</sup> از خون هپارینه سگها، روی فایکول (ساخت شرکت سیگما)<sup>۲</sup> و با استفاده از سانتریفور (۲۵°C / دقیقه  $800 \times g$ ) جدا شد، پس از دو بار شستشو در RPMI-۱۶۴۰ تعداد و درصد زنده بودن سلولها با استفاده از رنگ تربیان بلو تعیین گردید. سپس PBMC در پلیت ۹۶ خانه‌ای (Costar) با تعداد  $3 \times 10^6$  سلول در هر چاهک در حضور  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  CTE،  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  rCPB،  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  rCPA،  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  rF/T mg/ml،  $100 \mu\text{l}/\text{ml}$  HEPES (Sigma)،  $100 \text{mM}$  HEPES (USA) و  $1 \text{mM}$  دارکاتامین کشت داده شد و به مدت ۵ روز در انکوباتور  $37^\circ\text{C}$  و  $5\% \text{CO}_2$  قرار گرفت. سپس  $5 \mu\text{Ci}$  تیmidین تریتیوم دار (Amersham, UK) به هر چاهک اضافه و ۱۶ ساعت دیگر در همان شرایط نگهداری شد، پس از طی زمان مورد نظر سلولها به وسیله دستگاه سل هاروستر <sup>۳</sup> (LKB) روی فیلترهای فایبرگلاس <sup>۴</sup> (WALLAC, Turk, Finland) متقل و میزان اتصال تیmidین رادیواکتیو به وسیله دستگاه بتاکانتر <sup>۵</sup> (ساخت شرکت فارماسیا)<sup>۶</sup> اندازه‌گیری شده و ضریب تحریک <sup>۷</sup> براساس نسبت پرولیفراسیون در حضور آنتیژن به میزان پرولیفراسیون در

جدول ۱ نمایشی از تقسیم‌بندی سگها براساس شواهد فیزیکی و تستهای DAT و Dipstick

گروه	آزمایش+عالیم	آگلوبلیناسیون مستقیم	DAT	Dipstick rK39	وجود انگل در طحال	ضایعات پوسی	ریزش مو	lagueri مفرط	بزرگی و پیچیدگی ناخنها
دارای عالیم	*	٪ ۱۰۰	٪ ۸۵	٪ ۱۰۰	٪ ۴۲	٪ ۸۵	٪ ۱۰۰	٪ ۱۰۰	٪ ۲۸
بدون عالیم		٪ ۸۵	٪ ۸۵	تعیین نشد	هیچکدام	هیچکدام	هیچکدام	هیچکدام	هیچکدام

\* تعداد حیوانات با تست مثبت یا عالیم به صورت درصدی از گروه بیان شده‌اند.

وزن مولکولی rCPB و rCPA بترتیب ۲۸ و ۳۵ کیلو دالتون می‌باشد، وزن مولکولی پیتیدستتری CTE ۱۳kD است که اسید آمینه‌های CPB ۲۰۹-۳۱۷ را شامل می‌شود. (شکل ۱ الف و ب).

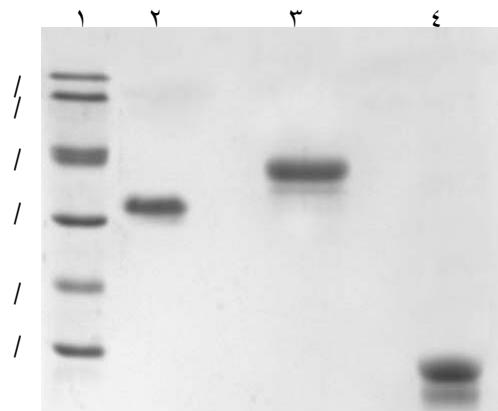
### ۳-۳- پاسخهای هومورال IgG کل، IgG<sub>1</sub> و (IgG<sub>2</sub>)

سرم چهارده قلاده سگ آلوده با استفاده از الیزا برای تعیین IgG کل و زیرکلاسهای آن علیه rCPB، rCPA، rF/T برسی شد. همانگونه که در شکل ۲-الف نشان داده شده است در همه

## ۲-۳- تهیه آنتیژنهای نوترکیب

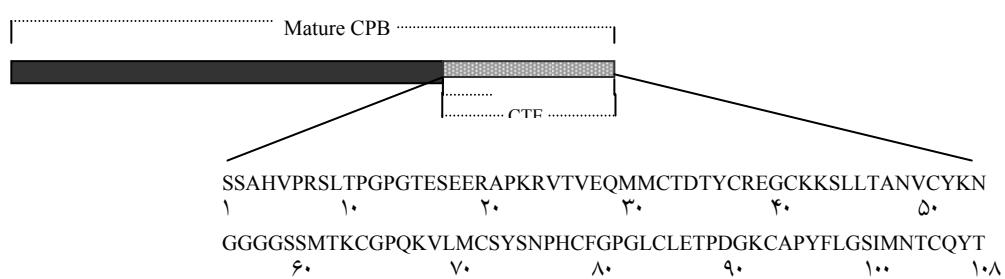
سیستمی پروتئینازهای نوترکیب با استفاده از روش‌های ذکر شده در قسمت ۲-۲-۲ خالص گردیدند و خلوص آنها در ژل SDS-PAGE و سپس رنگ آمیزی با کوماسی بلو بررسی شد.

1. Lymphocyte proliferation Assay
2. Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)
3. Histopaque 1077, Sigma, USA
4. Phytohemagglutinin (PHA)
5.  $[^3\text{H}]$  Thymidine
6. Cell Harvester
7. Glassfibre Filter
8.  $\beta$  Liquid Scintillation Counter
9. Pharmacia
10. Stimulation Index (SI)

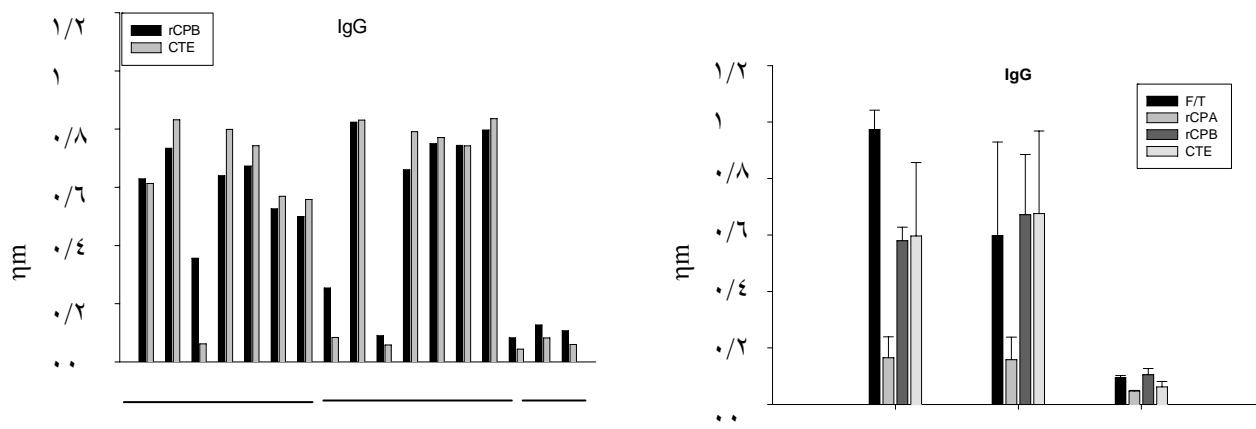


شکل ۱ الف بررسی الکتروفورزی سیستین پروتئینازهای نوترکیب A و B و خالص شده و پیتید سنتزی CTE. پروتئینها در ژل پلی‌آکریل آمید ۱۵٪ الکتروفورز و سپس با کوماسی بلورنگ آمیزی شدند. ستونها: ۱. مارکر وزن مولکولی (kD). ۲. rCPB. ۳. rCPA. ۴. CTE.

سگها بالاترین میزان IgG کل مربوط به F/T می‌باشد (در سگهای بدون علایم  $0/068 \pm 0/068$  و در سگهای دارای علایم  $0/060 \pm 0/060$ ). سیستین پروتئینازهای نوترکیب CPA و CPB به طور متفاوتی به وسیله سیستم ایمنی هر دو گروه حیوانات شناسایی می‌شوند به طوری که پاسخ هومورال بر علیه rCPB بسیار بیشتر از rCPA است. پاسخ IgG علیه CTE شبیه به می‌باشد (شکل ۲-ب). میزان آنتی‌بادی علیه این آنتی‌ژنهای در سگهای طبیعی بسیار پایین است و برای CTE rCPB rCPA و CTE rCPB rCPA بترتیب  $0/0015 \pm 0/00437$ ,  $0/0022 \pm 0/005$ ,  $0/0191 \pm 0/0062$  می‌باشد.



شکل ۱ ب نمایش شماتیک CPB بالغ و ردیف اسیدهای آmine CPB بالغ در لیشمانیا حدود ۳۲۶ اسید آmine دارد که حدود ۱۰۸ تای آن مربوط به انتهای کربوکسیل یا CTE است. ردیف اسیدهای آmine ناحیه CTE با علامت یک حرفی ذکر شده است. اعداد زیر حروف نشان‌دهنده شماره اسیدهای آmine هستند.



ب مقایسه IgG همه سگها به rCPB و CTE.

الف پاسخ IgG سگهای طبیعی (۳ قلاده) و سگهای آلووده (۷ قلاده دارای علایم و ۷ قلاده بدون علایم) به CTE rCPB rCPA F/T و CTE. اطلاعات در هر گروه به صورت میانگین جذب نوری در  $490\text{nm} \pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند.

شکل ۲ پاسخ IgG سگها به F/T, rCPB, rCPA, CTE و لیشمانیا اینفانتوم.

rCPA پایین است (سگهای دارای علایم  $0/123 \pm 0/114$  و بدون علایم  $0/118 \pm 0/118$ ), میزان IgG1 علیه rCPB و CTE در شکل ۳-ب مقایسه شده است. این میزان علیه rCPB و CTE بویژه در ۶ سگ (شماره ۲، ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴) بالاست.

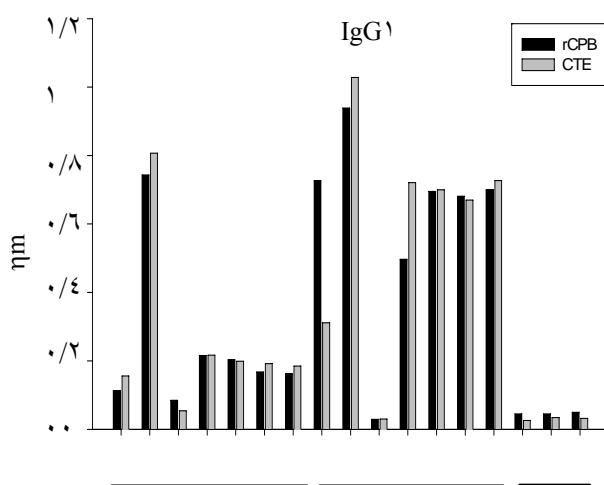
میزان IgG1 علیه چهار آنتی‌ژن در شکل ۳-الف نشان داده شده است. میزان IgG1 علیه F/T ناهمگونتر از بقیه آنتی‌ژنهای است و فقط شش سگ جذب بالاتر از  $0/5$  دارند (سگهای دارای علایم  $0/55 \pm 0/33$  و بدون علایم  $0/37 \pm 0/67$ ). میزان IgG1 نیز علیه

و  $0/۵۱ \pm ۰/۱۳$  CTE (در سگهای دارای علایم  $0/۳۵ \pm ۰/۳۸$ ) و بدون علایم  $0/۳ \pm ۰/۶۱$  به مقدار زیادی بالاست. بجز سه نمونه سگهای شماره ۳ و ۸ و ۱۰ در بقیه سگها میزان IgG۲ علیه CTE بیشتر از rCPB است.

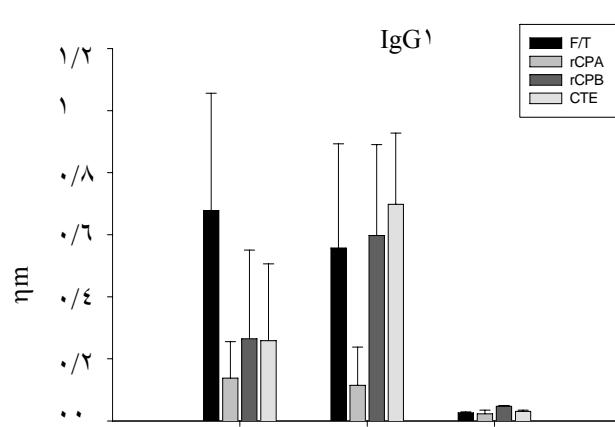
در سگهای دارای علایم میزان IgG۱ علیه CTE و rCPB بیشتر از IgG۲ است ( $P < ۰/۰۵$ ). بر عکس در حیوانات بدون IgG۲ ظاهرات بالینی F/T علیه IgG۲ rCPB و CTE بیشتر از rCPB است ( $P < ۰/۰۵$ ).

در تمام سگها بجز سگ شماره ۸ و ۱۱ میزان IgG۱ علیه CTE و rCPB مشابه است.

**شکل ۴-۴**- الف میزان IgG۲ علیه هر کدام از آنتیژنها را نشان می‌دهد، الگوی IgG۲ علیه F/T همانند IgG۲ کل علیه این آنتیژن است (برای سگهای دارای علایم  $0/۳۴ \pm ۰/۵۴$  و بدون  $0/۹۷ \pm ۰/۰۵$ ، میزان IgG۲ rCPA علیه IgG۲ همانند IgG۱ rCPA کل پایین است. برخلاف rCPA علیه IgG۲ rCPB علیه IgG۲ (در سگهای دارای علایم  $۰/۳۶ \pm ۰/۲۹$  و بدون علایم

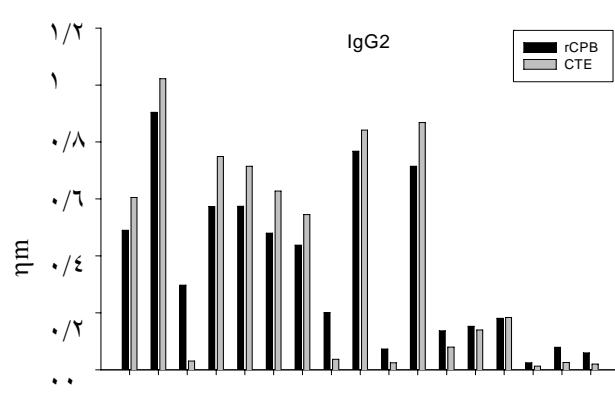


ب مقایسه IgG۱ همه سگها به rCPB و CTE.

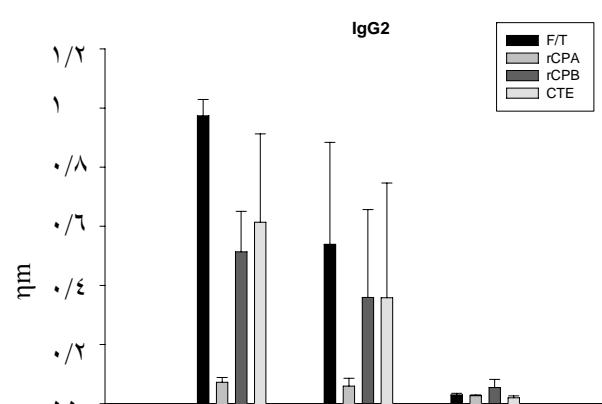


الف پاسخ IgG سگهای طبیعی (۳ قلاده) و سگهای آلوده (۷ قلاده دارای علایم و ۷ قلاده بدون علایم) به CTE، rCPB، rCPA، F/T و IgG۱ میانگین جذب نوری در  $۴۹۰\text{nm} \pm ۱\text{nm}$  انحراف معیار بیان شده‌اند.

شکل ۳ پاسخ IgG۱ سگها به F/T، rCPB، rCPA و CTE لیشمانا اینفانتوم.



ب مقایسه IgG2 همه سگها به rCPB و CTE.



الف پاسخ IgG سگهای طبیعی (۳ قلاده) و سگهای آلوده (۷ قلاده دارای علایم و ۷ قلاده بدون علایم) به CTE، rCPB، rCPA، F/T و IgG۲ میانگین جذب نوری در  $۴۹۰\text{nm} \pm ۱\text{nm}$  انحراف معیار بیان شده‌اند.

شکل ۴ پاسخ IgG۲ سگها به F/T، rCPB، rCPA و CTE لیشمانا اینفانتوم.

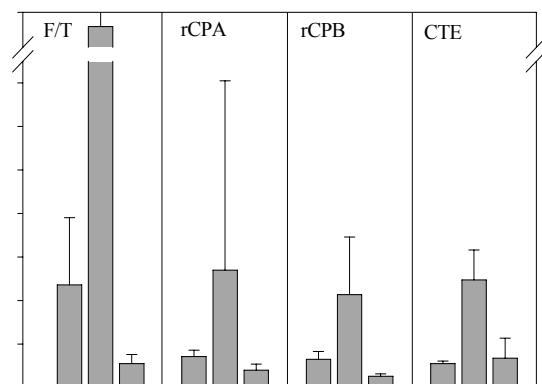
rCPB است. علاوه بر این، نتایج مانشان می‌دهد که میزان IgG2 ویژه آنتی‌زن‌های نوترکیب (rCPA، rCPB، rCE) و CTE آنتی‌زن خام لیشمانیا /ینفانتوم، در سگهای بدون تظاهرات بالینی بیشتر از میزان این آنتی‌بادی در سگهای دارای علایم می‌باشد. در حیوانات دارای تظاهرات بالینی میزان IgG1 ویژه rCPB و CTE بیشتر از IgG2 است.

پاسخهای هومورال سگهای آلوده نسبت به آنتی‌زن‌های خام لیشمانیا به‌وسیله تعدادی از محققان بررسی شده است [۴۰-۴۲]. پاسخ IgG علیه تعدادی از پروتئین‌های نوترکیب لیشمانیا /ینفانتوم (HSP70، HSP83، P2a، P2b، P0، H2A، H3، KMP11) به‌وسیله نیتو<sup>1</sup> و همکاران مطالعه شده است، براساس نتایج آنها در سگهای آلوده شده به‌طور تجربی، پاسخ هومورال علیه HSP70 در مراحل اولیه بیماری ظاهر می‌شود و میزان IgG بالا بر ضد پروتئین‌های هیستونی H2A و H3 نشانه پیشرفت بیماری است [۴۳]. زیرکلاس‌های IgG اختصاصی لیشمانیا /ینفانتوم اولین بار به‌وسیله دپلازس<sup>2</sup> در سگهای دارای علایم بالینی و درمان شده با گلوكاتنیم مورد مطالعه قرار گرفت.

در این مطالعه نشان داده شد که در تمام حیوانات در شروع بررسی میزان هر دو IgG1 و IgG2 بالاست اما پس از درمان میزان IgG1 کاهش یافته و IgG2 ثابت باقی می‌ماند [۴۴]. در تحقیق دیگری به‌وسیله گیچرو<sup>3</sup> و همکاران گزارشی شده است که فقط وجود آمدن تظاهرات بالینی نیست زیرا در تمام حیوانات و بوجود آمدن تظاهرات بالینی هومورال شدیدی علیه آنتی‌زن‌های لیشمانیا آلوده پاسخ ایمنی هومورال شدیدی علیه آنتی‌زن‌های لیشمانیا وجود دارد [۴۵]. نتایج ما تأیید‌کننده گزارش‌های این محققان است. علاوه بر این، نتایج گزارش شده به‌وسیله دپلازس از سگهای آلوده شده با لیشمانیا /ینفانتوم نشان داده است که IgG2 با نبود تظاهرات بالینی و IgG1 با پیشرفت بیماری و ظهور علایم بالینی در ارتباط است [۴۶]. در نتایج ما نیز میزان IgG2 علیه تمام آنتی‌زن‌ها در سگهای بدون تظاهرات بالینی بیشتر از IgG1 است و بر عکس در حیوانات دارای علایم میزان IgG1، بالاتر است. مطالعات زیادی وجود دارد که زیرکلاس‌های IgG را با پاسخ Th1/Th2 در ارتباط می‌دانند. در موش پاسخ Th1 با IgG2 و پاسخ IgG1 با Th2 مرتبط است [۴۶-۴۸]، با وجود این، مکانیسم ایمنولوژیکی که باعث مقاومت یا حساسیت در لیشمانیوز احشایی می‌گردد، مشخص نشده است؛ برخلاف مدل موشی L.major که پاسخ Th1 در مقاومت و Th2 در حساسیت

#### ۴-۳- پرولیفراسیون لنفوسيتها

PBMC هر دو گروه سگها در اثر فیتوهماگلوتین به‌طور مشابه تکثیر یافتند که نشان‌دهنده پاسخ غیر اختصاصی لنفوسيتها می‌باشد. بررسی پاسخ سلولی علیه F/T، rCPA، rCPB و CTE نشان داد در سگهای دارای علایم پاسخ سلولی علیه هر چهار آنتی‌زن بسیار پایین است اما سگهای بدون علایم پرولیفراسیون خوبی را در برابر آنتی‌زنها نشان دادند. SI این سگها نسبت به F/T از ۸۷/۷-۹/۳۳ متغیر بود ( $45/88 \pm 34/26$ ) که به‌طور معناداری از SI سگهای دارای علایم ( $4/7 \pm 3/09$ ) و سگهای نرمال ( $1/1 \pm 0/42$ ) بالاتر است ( $P < 0/05$ ) (شکل ۵)؛ همچنین سگهای بدون علایم پاسخهای سلولی بالاتری را علیه آنتی‌زن‌های خالص rCPB و CTE نسبت به سگهای دارای علایم نشان دادند ( $P < 0/05$ )؛ جالب توجه اینکه پاسخ سلولی علیه CTE همانند پاسخهای هومورال، شبیه پاسخ سلولی علیه rCPB است. پاسخ سلولی علیه rCPA در دو گروه سگها معنادار نبود ( $P > 0/05$ ).



شکل ۵ پاسخ پرولیفراسیون لنفوسيتها سگها بعد از ۵ روز انکوباسیون در حضور rCPB، F/T، rCPA و CTE. اطلاعات در هر گروه به صورت میانگین ضریب تحریک  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند.

#### ۴- بحث

بررسی پاسخهای سلولی و هومورال سگهای آلوده به لیشمانیا /ینفانتوم نسبت به سیستین پروتئینازهای نوترکیب تفاوت‌هایی را در سگهای بدون تظاهرات بالینی و سگهایی با علایم ظاهری بیماری نشان می‌دهد. میزان IgG کل و زیرکلاس‌های IgG1 و IgG2 علیه F/T در هر دو گروه سگها بیشتر از آنتی‌بادی ضد آنتی‌زن‌های نوترکیب سیستین پروتئیناز است. پاسخ ایمنی هومورال علیه rCPA در همه حیوانات کمتر از آنتی‌بادی ضد

1. Nieto  
2. Deplazes  
3. Gicheru

داده شده است که CPA و CPB لیشمانیا مازور پاسخهای Th<sub>1</sub> را در بیماران مبتلا به لیشمانیوز ناشی از *L. guyanensis* القا می‌کنند [۵۰].

نتایج تحقیق ما برای اولین بار نشان می‌دهد که CPB می‌تواند به وسیله سیستم ایمنی هومورال و سلولی سکگهای آلووه بخوبی شناسایی شود و تولید زیر کلاس IgG<sub>2</sub> و پرولیفراسیون لنفوسيتها را در سکگهای مقاوم باعث گردد. افزون بر آن، در مطالعه حاضر نشان داده شد که پاسخ هومورال و سلولی CTE و CPB تقریباً یکسان است. با توجه به اینکه CTE بخش انتهای سیستئین پروتئیناز نوع I می‌باشد، به نظر می‌رسد که بخش اعظم اینتوژنیستیه CPB مربوط به این ناحیه باشد. اگرچه نیاز است اطلاعات بیشتری بخصوص در مورد مدل انسانی به دست آید، اما این امکان وجود دارد که در آینده CTE به جای iCPB به عنوان ایمونوژن استفاده گردد؛ به ویژه اینکه CTE را می‌توان به صورت فوق العاده خالص ستز کرد.

## ۵- تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از خانمها یاسمون تسلیمی و فاطمه دوستداری برای همکاری در اجرای آزمایشها و همکاران محترم ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر خصوصاً آقای ذبیح الله زارعی به علت همکاری در تهیه نمونه از سکگهای آلووه اعلان دارند. مطالعه فوق با استفاده از گرانت سازمان بهداشت جهانی (شماره A10115) و انسستیو پاستور ایران (شماره ۱۸۵) به دکتر رافتی انجام شده است.

نسبت به بیماری نقش دارد، نقش این رده‌های سلولی در لیشمانیوز احساسی انسان و سگ مشخص نیست، به نظر می‌رسد ترکیبی از Th<sub>1</sub> و Th<sub>2</sub> در این بیماری دخالت داشته باشد. بررسی پاسخهای سلولی حیوانات آلووه نشان دهنده مهار پاسخ سلولی سکگهای دارای تظاهرات بالینی نسبت به تمام آنتی‌ژنهای نوترکیب می‌باشد. نبود ایمنی سلولی که بیانگر مهار ایمنی می‌باشد به وسیله بسیاری از محققان دیگر نیز در سکگهای دارای علایم نشان داده شده است [۴۹، ۴۲، ۱۲، ۸].

در مطالعه حاضر، نیز سکگهای بدون تظاهرات بالینی که نسبتاً به بیماری مقاومند پرولیفراسیون قابل ملاحظه‌ای در مقابل iCPB و CTE داشتند؛ این پرولیفراسیون به طور معناداری بیشتر از پرولیفراسیون سکگهای دارای علایم بود اما پاسخهای ایمنی برعلیه iCPA در تمام حیوانات پایین است. علت تفاوت پاسخ ایمنی برعلیه این دو سیستئین پروتئیناز احتمالاً این است که: ۱- در ژنوم لیشمانیا ژنهای CPB چندین بار تکرار شده‌اند در حالی که ژن CPA تک کپی می‌باشد، این خصوصیت ممکن است باعث بیان و عرضه بیشتر CPB به سیستم ایمنی میزان گردد؛ ۲- CPB برخلاف CPA دارای ناحیه CTE می‌باشد که باعث اینتوژنیستیه بیشتر آن می‌شود؛ ۳- قطعه CTE در کاتپسینهای پستانداران کد نمی‌شود که خود سبب آنتی‌ژنیستیه بیشتر لیشمانیا برای سیستم ایمنی میزان پستاندار می‌گردد.

در مطالعات قبلی به وسیله رافتی و همکاران گزارش شده است که سیستئین پروتئینازهای طبیعی تخلیص شده از آماتیگوتها لیشمانیا مازور باعث تکثیر سلولهای تک هسته‌ای بیماران بهبود یافته از لیشمانیوز پوستی شده و تولید γ-IFN به وسیله این سلولها را باعث می‌گردد [۳۵]. بتازگی هم نشان

## ۶- منابع

- [1] Herwoldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999; 354: 1191-9.
- [2] Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. Clin. Dermatol. 1996; 14: 417-23.
- [3] Abrantes P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur L, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. Parasite Immunol. 1991; 13: 537-50.
- [4] Nadim A. Present status of kala-azar in Iran. Am J. Trop. Med. Hyg. 1978; 27: 25-8.
- [5] Bettini S, Gradoni L. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. Insect. Sci. Appl. 1986; 7: 241-5.
- [6] Duan S, Frommel D, Monjour L, Ogunkolade BW, Cruz A, Quilici M. Vaccination trials against canine visceral leishmaniasis. Parasite Immunol. 1989; 11: 397-402.
- [7] Tesh RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995; 52: 287-92.

- [8] Cabral M, O'Grady JE, Alexander J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. Parasite Immunol. 1992; 14: 531-9.
- [9] Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. Vet. Parasitol. 1998; 76: 173-80.
- [10] Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. Adv Parasitol 1992; 32: 161-259.
- [11] Locksley RM, Louis JA. Immunology of leishmaniasis. Curr. Opin. Immunol. 1992; 4: 413-8.
- [12] Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenhaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenberg J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect. Immun. 1994; 62: 229-35.
- [13] Wilson ME, Young BM, Andersen KP, Weinstock JV, Metwali KM, Donelson JE. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. Infect. Immun. 1995; 63: 2062-69.
- [14] Web JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, et al. Human and murine immune responses to a novel *L. major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. Infect. Immun. 1998; 66: 3279-89.
- [15] Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Blomm BR, Russell D. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant Bacilli Calmette Guerin expressing the *Leishmania* surface protein gp63. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993; 90: 11437-47.
- [16] Sjolander A, Baldwin TM, Curtis JM, Handman E. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. J. Immunol. 1998; 160: 3949-57.
- [17] Skeiky YAW, Benson DR, Guderian JA, Whittle JA, Bacelar O, Carvalho EM, et al. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. Infect. Immun. 1995; 63: 4105-14.
- [18] Skeiky YAW, Kennedy M, Kaufaman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, et al. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. J. Immunol. 1998; 161: 6171-9.
- [19] Campos-Neto A, Soong L, Cordova JL, Sant'Angelo D, Skeiky YAW, Ruddle NH, et al. Cloning and expression of a *Leishmania donovani* gene instructed by a peptid isolated from major histocompatibility complex class II molecules of infected macrophages. J. Exp Med. 1995; 182: 1423-33.
- [20] Web JR, Kaufman D, Campos-Neto A, Reed SG. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. J. Immunol. 1996; 157: 5034-41.
- [21] Solioz N, Blum-Tirouvanziam U, Jacqute R, Rafati S, Corradin G, Mael J, et al. The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis. Vaccine 1999; 18: 850-9.
- [22] Rafati S, Kariminia A, Seyd Eslami S, Narimani M, Taheri T, Lebbatard M. Recombinant cysteine protease-based vaccine against *Leishmania major* in BALB/c mice: the role partial protection relies on interferon gamma CD8<sup>+</sup> T lymphocyte activation. Vaccine 2002; 20: 2439-47.
- [23] Pukpis M, Tetely L, Coombs G. *Leishmania mexicana*: amastigote hydrolases in unusual lysosome. Exp. Parasitol. 1986; 62: 29-39.
- [24] Coombs GH. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. Parasitology 1982; 84: 149-55.

- [25] Mottram JC, Robertson CD, Coombs GH, Barry JD. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Mol. Microbiol.* 1992; 6: 1925-32.
- [26] Rafati S, Fasel N, Masina S. *Leishmania* cysteine proteinases: from gene to subunit vaccine. *Curr. Genom.* 2003; 4: 109-21.
- [27] Souza A, Waugh S, Coombs GH, Mottram JC. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett.* 1992; 311: 124-7.
- [28] Mundodi V, Somanna A, Farrell PJ, Gedamu L. Genomic organization and expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. *Gene* 2002; 282: 257-65.
- [29] Mottram JC, North MJ, Barry JD, Coombs GH. A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzym with an unusual C-terminal extension. *FEBS Lett.* 1989; 258: 211-5.
- [30] Traub-Cseko YM, Duboise M, Boukai LK, McMahon-pratt D. Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes using the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993; 57: 101-16.
- [31] Coombs GH, Baxter J. Inhibition of *Leishmania* amastigot growth by antipain and leupeptin. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1984; 78: 215-24.
- [32] Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Role of cysteine proteinases of trypansomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 1998; 1: 455-60.
- [33] Coombs GH, Mottram JC. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibility for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology* 1997; 114: 61-80.
- [34] Rafati S, Couty-Jouve S, Alimohammadian MH, Louis JA. Biochemical analysis and immunogenicity of *Leishmania major* amastigote fractions in cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 110: 203-11.
- [35] Rafati S, Abraham-Baba A, Bakhshayesh M, VaFa M. Vaccination of BALB/c mice with *Leishmania major* amastigote-specific cysteine proteinase. *Clin. Exp. Immunol.* 2000; 120: 134-8.
- [36] Rafati S, Salmanian A, Hashemi K, Schaff C, Belli S, Fasel N. Identification of *Leishmania major* cysteine proteinases as targets of the immune response in human. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001; 113: 35-43.
- [37] Rafati S, Nakahae A, Salmanian A, Jimenez M, Ghashghaii A, Mohebali M, et al. Cysteine proteinase type I and II of *Leishmania infantum* are recognized by sera during canine and human visceral leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 2003; 103: 143-51.
- [38] Ortiz ML, Calero M, Patron CF, Castellanos L, Mendez E, Imidazole-SDS-Zn reverse staining of proteins in gels containing or not SDS and microsequencing of individual unmodified electroblotted proteins. *FEBS Lett.* 1992; 296: 300-4.
- [39] Roggero MA, Servis C, Corradin G. A simple and rapid procedure for the purification of synthetic polypeptides by a combination of affinity chromatography and methionine chemistry. *FEBS Lett.* 1997; 408: 285-8.
- [40] Carrera L, Fermin ML, Tesouro M, Gracia P, Rollan E, Gonzalez JL. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp. Parasitol.* 1996; 82: 139-46.
- [41] Acedo-Sanchez C, Morillas-Marquez F, Sanchez-Marin MC, Martin-Sanchez J. Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. *Vet. Parasitol.* 1996; 75: 1-8.
- [42] Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, et al. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally

- and experimentally infected with *Leishmania infantum*. Vet. Parasitol. 1999; 81: 173-84.
- [43] Nieto CG, Garcia-Alanso M, Requena JM, Mirom C, Soto M, Alonso C, et al. Analysis of humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999; 67: 117-30.
- [44] Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody response of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. Parasite Immunol. 1995; 17: 451-8.
- [45] Gicheru MM, Olobo JO, Kariuki TM, Adhiambo C. Visceral leishmaniasis in vervet monkeys: immunological responses during asymptomatic infection. Scand. J. Immunol. 1995; 41: 202-20.
- [46] Reed S, Scott P. Tcell cytokine response in leishmaniasis. Curr. Opin. Immunol. 1993; 5: 542-31.
- [47] Kawano Y, Noma T, Yata J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines IFN- $\gamma$  and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in induction of IgG2. J. Immunol. 1994; 153: 4948-58.
- [48] Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. Infect. Immun. 1994; 62: 1058-63.
- [49] Launa RD, Vuotto ML, Ielpo MTL, Ambrosio R, Piantedosi D, Moscatiello V, et al. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999; 70: 95-103.
- [50] Pascalis H, Lavergen A, Bourrea E, Prevost-Linguet G, Kariminia A, Pradinaud R, Rafati S, et al. Th1 cell development induced by cysteine proteinases A and B in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. Infect. Immun. 2003; 71: 2924-6.